

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テームド (参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		45/00	4 B 0 2 4
38/00		48/00	4 B 0 6 4
45/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 5
48/00		1/04	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の枚数21 O L (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-382474 (P2000-382474)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成12年12月15日 (2000.12.15)	(72) 発明者	日沼 州司 東京都つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ1402号
(31) 優先権主張番号	特願平11-358707	(72) 発明者	稲住 昌司 東京都つくば市並木3丁目17番地6 ロイ ヤルシティ並木302号
(32) 優先日	平成11年12月17日 (1999.12.17)	(74) 代理人	100093676 弁理士 小林 純子 (外5名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願2000-46825 (P2000-46825)		
(32) 優先日	平成12年2月18日 (2000.2.18)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ポリペプチドおよびそのDNA

(57) 【要約】

【課題】新規ポリペプチドおよびそのDNAなどの提供。

【解決手段】下垂体前葉ホルモンに関連する生理活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物のスクリーニング方法等。

【効果】本発明のポリペプチドは、例えば下垂体前葉ホルモンに関連する生理活性を有するため、高血圧、自己免疫疾患、心不全等の治療薬として使用できる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる化合物は高血圧、自己免疫疾患、心不全等の予防・治療薬として期待される。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識できるので、診断中の本発明のポリペプチドの定量等に使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 2】 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：11 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 3】 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：5 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 4】 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：13 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 5】 請求項 1 記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 6】 請求項 1 記載のポリペプチドをコードする DNA を含有する DNA。

【請求項 7】 配列番号：2、配列番号：6、配列番号：12 または配列番号：14 で表される塩基配列を有する請求項 6 記載の DNA。

【請求項 8】 請求項 5 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する DNA。

【請求項 9】 請求項 6 または請求項 8 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 10】 請求項 9 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 11】 請求項 10 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 5 記載の部分ペプチドを生成・精製せしめることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 9 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

【請求項 12】 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

【請求項 13】 請求項 12 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法。

【請求項 14】 請求項 6 もしくは請求項 8 記載の DNA または請求項 12 記載の抗体を含有する診断薬。

【請求項 15】 請求項 6 または請求項 8 記載の DNA の

塩基配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するアンチセンス DNA。

【請求項 16】 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する薬剤。

【請求項 17】 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する薬剤。

【請求項 18】 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 19】 請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 20】 請求項 18 記載のスクリーニング方法または請求項 19 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 21】 請求項 18 記載のスクリーニング方法または請求項 19 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または請求項 5 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有する薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は下巻体由率の新規ポリペプチド、その部分ペプチドおよびそれらをコードする DNA などに関する。特にそれ単独で活性を有する、あるいはサブユニット構造をとることにより活性を有することを特徴とする全く新規のポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】下垂体は脳の直下に存在する内分泌器官であり、さまざまな生体活性物質やホルモンを分泌し、内分泌系の中心的な役割を担っている。下垂体はその構造上前葉、中葉、後葉に分けられ各々が特異的なホルモンを分泌し、代謝、成長、生殖、恒常性維持、精神活動、生体防御など生体の機能を調節している。これらのホルモンの分泌は視床下部より放出されるホルモンなど多様な因子により調節を受けている。下垂体から分泌されるホルモンは種々の組織の細胞膜上の特異的な受容体に結合することによりその情報を細胞に伝えている。これまでにこのようなホルモンの多くは、その生体活性に基づいて組織抽出物等から単離されその構造が決定されてきた。また最近では受容体を利用して組織抽出物等からさまざまな生体活性物質やホルモンを単離することもなされるようになってきた。一方、最近のゲノムやcDNAの配列解析の急速な進展により、膨大なDNA情報が入手可能になった。これらのDNAの中にはこれまで未知であった生体活性物質をコードする配列が含まれていることが推定される。しかしゲノムDNA配列やExpressed Sequence Tag (EST) から、ホルモンのような生体活性を有する未知のポリペプチドを解するとしても、既知の生体活性ポリペプチドに類似した配列は、しばしばまったく無関係な蛋白の遺伝子や非翻訳領域のDNA配列にも見出され、さらには偽遺伝子の存在の可能性もあるため、それらの中からどれが本当の生体活性ポリペプチドであるかどうかを確定することは困難であった。下垂体前葉ホルモンとしては現在までに、プロラクチン(PRL)、成長ホルモン(GH)、副腎皮質ホルモン(ACH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、卵巣刺激ホルモン(FSH)、骨形成ホルモン(BMP)が知られている。特にこれらのうちTSH、FSH、LHはアルファ、ベータのサブユニット構造をとる糖蛋白質ホルモンである。アルファ鎖はこれらのホルモンの共通であるが、ベーター鎖は構造上の差異が大きくそれぞれのホルモンの特異的な生物活性はベーター鎖に由来している。また、活性の発現には通常アルファ、ベータからなるサブユニット構造が必要である。アルファ鎖は5個のS-S結合と2個の糖結合部位を、ベーター鎖も8個のS-S結合と一個の糖結合部位を有している。また糖鎖も活性の発現に重要な役割を果たしているものと考えられている。(A.J.Lapthorn, Nature (1994) 369, 455-461) 一方これらの下垂体前葉ホルモンの生体活性に関してはさまざまな報告がある。FSHはLHと哺乳類の性腺の増殖と分化に関して必須の因子である。FSHは精巣において精子形成を促進し、卵巣では濾胞の発達を促進する。LHは精巣からのアンドロゲンの分泌を促進し、卵巣では排卵を促進する。TSHは甲状腺の機能調節に関して必須のホルモンである。以上のように下垂体由来の糖蛋白質ホルモンに関しては多くの非常に重要な生体作用が報告されている。しかもTSH、FSH、LH以外に哺乳動物で

知られている下垂体由来の糖蛋白質ホルモンはまったく知られていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、未知の下垂体由来のポリペプチドおよびそれをコードする遺伝子を見出し、それを直接利用した、あるいはアコニスト、アンタゴニストを用いた疾患の予防、治療薬の開発が望まれていた。

【0004】

- 10 【課題を解決するための手段】本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、プライマーを作成し、ヒト下垂体poly(A)⁺RNAを模型とするRT-PCRにより、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られたcDNAにコードされているポリペプチドが有用な下垂体糖蛋白質ホルモンであることを見出し、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果本発明を完成するにいたった。

【0005】すなわち、本発明は、

- 20 (1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：11で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 30 (3) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：5で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (4) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：13で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (5) 上記(1)記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (6) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
- 40 (7) 配列番号：2、配列番号：6、配列番号：12または配列番号：14で表される塩基配列を有する上記(6)記載のDNA、
- (8) 上記(5)記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
- (9) 上記(6)または(8)記載のDNAを含有する組織交換ベクター、
- (10) 上記(9)記載の組織交換ベクターで形質転換された形質転換体、
- (11) 上記(10)記載の形質転換体を培養し、上記
- 50 (1)記載のポリペプチドまたは上記(5)記載の部分

ペプチドを生成・蓄積はしめることを特徴とする上記

(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

(12) 上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(13) 上記(12) 記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法、

(14) 上記(8) もしくは(8) 記載のDNA または上記(12) 記載の抗体を含有してなる診断薬、

(15) 上記(8) または(8) 記載のDNA の塩基配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を有し、該DNA の発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、

(16) 上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤、

(17) 上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(18) 上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) 上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングキット、

(20) 上記(18) 記載のスクリーニング方法または上記(19) 記載のスクリーニングキットを用いて得られる上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(5) 記載

の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(21) 上記(18) 記載のスクリーニング方法または上記(19) 記載のスクリーニングキットを用いて得られる上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または上記

(5) 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

【0006】 さらには、本発明は、

(22) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および

(23) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列中の1~20個(好ましくは1~15個、さらに好ましくは1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列に1~20個(好ましくは1~15個、さらに好ましくは1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列に1~20個(好ましくは1~15個、さらに好ましくは1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列中の1~20個(好ましくは1~15個、さらに好ましくは1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1) 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などを提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明の配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド(以下、本発明のポリペプチドと称することもある)は、ヒトや霊長動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、顕微細細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、幹細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、微循環細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、骨髄細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、乳腺細胞

腔、肝細胞もしくは肝質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞等)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、腎臓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生生殖腺、甲状腺、胆のう、腎臓、副腎、皮膚、筋肉、筋、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、肺臓、膀胱、腸下腺、末梢血、両立腺、鼻丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨髄腔など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL-1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MO LT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HS B-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

【0008】配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相溶性を有するアミノ酸配列などがあげられる。特に、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、

(i) 配列番号:1または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中の1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号:1または配列番号:11で表されるアミノ酸配列に1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号:1または配列番号:11で表されるアミノ酸配列に1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号:1または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中の1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(v) 上記(i)〜(iv)を組み合わせたアミノ酸配列、

(vi) 配列番号:1のN末端から36番目、50番目、60番目、64番目、84番目、99番目、115番目、117番目、120番目、127番目のCysおよび87番目のAsn以外のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換された、または配列番号:11のN末端から35番目、49番目、59番目、63番目、8

3番目、98番目、114番目、116番目、119番目、126番目のCysおよび86番目のAsn以外のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換されたアミノ酸配列、

(vii) 配列番号:1のN末端から36番目、50番目、60番目、64番目、84番目、99番目、115番目、117番目、120番目、127番目のCysおよび87番目のAsn以外のアミノ酸(残基)中、1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換された、または配列番号:11のN末端から35番目、49番目、59番目、63番目、83番目、98番目、114番目、116番目、119番目、126番目のCysおよび86番目のAsn以外のアミノ酸(残基)中、1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換されたアミノ酸配列、

(viii) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜24番の部分アミノ酸配列または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜23番の部分アミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、

(ix) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜24番の部分アミノ酸配列または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜23番の部分アミノ酸配列が欠失し、さらに残りのアミノ酸配列の1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(x) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜24番の部分アミノ酸配列または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜23番の部分アミノ酸配列が欠失し、さらに残りのアミノ酸配列に1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(xi) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜24番の部分アミノ酸配列または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜23番の部分アミノ酸配列が欠失し、さらに残りのアミノ酸配列の1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(xii) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜24番の部分アミノ酸配列または配列番号:11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1〜23番の部分アミノ酸配列が欠失し、さらに残りのアミノ酸配列の1〜20個(好ましくは1〜15個、さらに好ましくは1〜5個、より好ましくは、1〜3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(xiii) 上記(xvii)～(xx)を組み合わせたアミノ酸配列。

(xiv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1～24番の部分アミノ酸配列または配列番号：11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1～23番の部分アミノ酸配列が欠失し、配列番号：1のN末端から36番目、50番目、60番目、64番目、84番目、99番目、115番目、117番目、120番目、127番目のCysおよび87番目のAsn以外のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換された。または配列番号：11のN末端から35番目、49番目、59番目、63番目、83番目、98番目、114番目、116番目、119番目、126番目のCysおよび86番目のAsn以外のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換されたアミノ酸配列。

(xv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中のN末端から1～24番の部分アミノ酸配列または配列番号：11で表されるアミノ酸配列中のN末端から1～23番の部分アミノ酸配列が欠失し、配列番号：1または配列番号：11のN末端から36番目、50番目、60番目、64番目、84番目、99番目、115番目、117番目、120番目、127番目のCysおよび87番目のAsn以外のアミノ酸(残基)中、1～20個(好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個)のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換された。または配列番号：11のN末端から35番目、49番目、59番目、63番目、83番目、98番目、114番目、116番目、119番目、126番目のCysおよび86番目のAsn以外のアミノ酸(残基)中、1～20個(好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個)のアミノ酸(残基)が他のアミノ酸(残基)で置換されたアミノ酸配列。

(xvi) 配列番号：1のN末端から25～36番の部分アミノ酸配列または配列番号：11のN末端から24～35番目の部分アミノ酸配列に1～5個、好ましくは、1～3個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列。

(xvii) 配列番号：1のN末端から25～36番の部分アミノ酸配列または配列番号：11のN末端から24～35番目の部分アミノ酸配列に1～5個、好ましくは、1～3個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列。

(xviii) 配列番号：1のN末端から25～36番の部分アミノ酸配列または配列番号：11のN末端から24～35番目の部分アミノ酸配列に1～5個、好ましくは、1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列。

(xix) 配列番号：1のN末端から25～36番の部分アミノ酸配列または配列番号：11のN末端から24～35番目の部分アミノ酸配列の1～5個、好ましくは、1～3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列。

(xx) 上記(xvi)～(xviii)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

【0009】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同量の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。実質的に同量の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性(例えば、後述の疾患の予防・治療活性、受容体との結合活性、受容体発現細胞に対する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜橋位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性等)などがあげられる。実質的に同量とは、それらの活性が性質的に(例、生化学的に、または薬理的に)同量であることを示す。本発明のポリペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜橋位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性等)が観察されるものなどがあげられる。具体的には、

- ① LGR4 (AGMF05) (Molecular Endocrinology(1998)12, 1830-1845; WO 99/15545号)。
 - ② LGR5 (HG38) (Molecular Endocrinology(1998)12, 1830-1845; EPCR (1998) 247, 266-270; WO 99/15660号)。
 - ③ LGR7 (WO 99/48921号)
 - ④ FSH受容体、
 - ⑤ LH受容体、
 - ⑥ TSH受容体
- などがあげられる。

配列番号：1と実質的に同一のアミノ酸配列としてより具体的には、例えば配列番号：5で表されるアミノ酸配列(すなわち、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から1～24番の部分アミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列)、配列番号：11で表されるアミノ酸配列、配列番号：13で表されるアミノ酸配列(すなわち、配列番号：11で表されるアミノ酸配列のN末端から1～23番目の部分アミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列)などがあげられる。

【0010】本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド鎖の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドとは

じめとする。本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₄アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅₋₆シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルメチルなどのC₆₋₁₂アールキル基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アルキル基のほか、環状エステルとして用いられるピロロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₂アルカノイル基などのC₁₋₄アルキル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₂アルカノイル基などのC₁₋₄アルキル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のポリペプチド中、糖鎖が結合（付加）する部位は、糖鎖が結合しうる部位であれば特に限定されないが、例えば配列番号：1のN末端から87番目または配列番号：11のN末端から86番目のAsnなどがあげられる。糖鎖を形成する糖としては、例えば、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、D-マンノース、D-ガラクトース、L-フコース、シアル酸などがあげられる。糖鎖との結合様式は、N-グリコシド結合（N-アセチル-D-グルコサミンとAsn間の結合）、O-グリコシド結合（N-アセチル-D-ガラクトサミンとSerまたはThr間の結合、D-ガラクトースとヒドロキシリン間の結合）などがあげられるが、本発明のポリペプチドの結合様式はN-グリコシド結合（N-アセチル-D-グルコサミンとAsn間の結合）であることが好ましい。またそのN-グリコシド結合のAsn糖鎖構造としては、高マンノース型、複合型および混合型があげられる。

【0111】本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有す

るポリペプチド、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどがあげられる。本発明のポリペプチドの部分ペプチドとしては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドであればいかなるものでもよい。本発明のポリペプチドの部分ペプチドとして具体的に、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から25～35番目の部分アミノ酸配列からなるペプチド、121～130番目の部分アミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号：11で表されるアミノ酸配列のN末端から24～34番目の部分アミノ酸配列からなるペプチド、120～129番目の部分アミノ酸配列からなるペプチドなどがあげられる。また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列中に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有していてもよく、それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有していてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のポリペプチドと同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているものも含まれる。また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも本発明のポリペプチドの有する活性を有する必要はない。

【0112】本発明のポリペプチドもしくはそのアミノ酸もしくはそのエステルまたはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、炭酸、水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレ酸、リン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、テトラヒドロメタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや霊長動物の細胞または組織から自己公知の

ポリペプチドの精製方法によって製造することもできる。後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせたことにより精製分離することができる。

【0013】本発明のポリペプチド、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロメル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリアル樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルペンシドリアルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自己公知の各種精製方法に従い、樹上で重合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に高価保護基を除去し、さらに高価精製液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を實施し、目的のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の重合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジシソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制剤添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、好適酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。保護アミノ酸の活性化や樹脂との重合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N、N-ジメチルホルムアミド、N、N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル

類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド縮合形成反応に使用されることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸試薬は通常1.5～4倍過剰に用いられる。ニヒドリオン反応を用いたテストの結果、重合が十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく重合反応を繰り返すことにより十分な重合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な重合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0014】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Boc、1-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、オクチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラールキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ペンシドリアルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、1-トリブチルオキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロキシル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラン基、 α -ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl₂-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、メチル基などが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DMP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Tf、Fmocなどが用いられる。

【0015】原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、ジシド、活性エステル【アルコール（例えば、ベンタクロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4,6-ジニトロフェノール、シアンメチルアルコール、パラニトロフェノール、HEX、N-ヒドロキシシスグミド、N-ヒドロキシフタ

ルイミド、HOBt) とのエステル) などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱保護)方法としては、例えば、P-d-基あるいはP-d-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での触媒還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱保護反応は、一般に約-20℃〜40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン錯体錯の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去される。トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下で酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。原料の反応に關与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に關与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

【0016】本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(ポリペプチド)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシ基の保護基を除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られる保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の組ポリペプチドを得ることができる。この組ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を単結晶化することによって所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得ることができる。本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

【0017】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自他公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の

ポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残基部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①〜⑩に記載された方法があげられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti, ペプチド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience Publisher s, New York (1966年)
- ②Schroeder および Luecke, ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他, ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株)(1975年)
- ④矢島治明 および柳原俊平, 生化学実験講座 1, タンパク質の化学IV, 205, (1979年)
- ⑤矢島治明監修, 統経薬品の開発, 第14巻, ペプチド合成, 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものでもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

【0018】本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 2または配列番号: 12で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 2または配列番号: 12で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同様の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。配列番号: 2または配列番号: 12で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条

件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クロニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

【0019】本発明のポリペプチドと実質的に同様の活性を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば配列番号：6または配列番号：14で表される塩基配列を有するDNAなどがあげられる。より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。さらに、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：14で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲムDNA、ゲムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

【0020】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：12で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：2または配列番号：12で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同様の活性を有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：2または配列番号：12で表わ

される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものを用いられる。配列番号：2または配列番号：12で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAでコードされるポリペプチドは後述の本発明のポリペプチドの製造法と同様にして製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明のポリペプチドのアミド、エステル、塩と同様のものなどがあげられる。

【0021】また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的に、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から25~35番目の部分アミノ酸配列もしくは配列番号：11で表されるアミノ酸配列のN末端から24~34番目の部分アミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から121~130番目の部分アミノ酸配列もしくは配列番号：11で表されるアミノ酸配列のN末端から121~130番目の部分アミノ酸配列からなるペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

【0022】本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチドまたは本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチドをコードするDNAは、自公知の方法で糖基化されていてもよく、具体的にはアイトーブラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルルセインなどによる蛍光標識）、ヒオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クロニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0023】DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Kit (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、QDA-LAFC法やGapped duplex法やKunkel法等の自公知の

方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有しているもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0024】本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、スファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40ori)と略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ヒシドリン産生還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合

合がある、G418耐性)等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、αアミラーゼ・シグナル配列、サブチ

10 リシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などは、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

20 【0025】エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1(プロシーデングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、60巻、160(1968))、JM103(スクレイク・アッシュ・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981))、JA221(Jジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、1(Journal of Molecular Biology)、120巻、517(1978))、HB101(Jジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969))、C600(ジェネティクス(Genetics)、39巻、440(1954))などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) M1114(ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984))などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シジサッカロマイセス ホンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913、NCYC2036、ピキア パストリス(Pichia pastoris) KM71などが用いられる。

【0026】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA CNPVの場合は、夜室蟬の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia mの中腸由来のMG細胞、Trichoplusia mの卵由来のHigh Five[®]細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイル

スがBmNPVの場合は、重組芽生化細胞(Bombix mori NPV細胞:BmNPV細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL711)、Sf21細胞(以上、Vaudon, J. L.ら、イン・ヴィボ(In vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる(前図ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985))。動物細胞としては、例えば、細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr-)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA17-20、マウスミエロマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0027】昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー(BioTechnology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル、263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、ホリベクトをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア菌、バチルス菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コリンチン・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムな

どがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地[ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972]が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率的に働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0028】宿主がエシェリヒア菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス菌の場合、培養は通常約3~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー(Burkholder)最小培地(Bostian, K. L.ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980))や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A.ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984))があげられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約2~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium(Grace, T. C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))に非酸化した10%血清血清等の添加物を適量加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6~2~8、4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science), 122巻, 501(1952))、DMEM培地(ヴィロロジー(Virology), 8巻, 396(1959))、RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967))、199培地(プロシージングズ・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950))などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のよ

うにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

【0029】本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または溶菌酵素などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離する過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適用される。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせるで行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や塩析法などの溶解度を利用する方法、透析法、膜ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られる場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができる。逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、遊離体が生成するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニンエステラゼ、プロテinkinナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0030】本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の例であってもよい。本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩（以下、抗体の説明において、これらを単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造すること

ができる。

【0031】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a)モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは抗体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2〜6週毎に1回ずつ、計2〜10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イス、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、病原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体産生の認められた個体を選択し最終免疫の2〜5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓細胞に融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、クーラーとミルスタインの方法【ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)】に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2-0、AP-1などの温血動物の骨髓細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓細胞数との好ましい比率は1:1〜20;1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000〜PEG6600）が10〜80%程度の濃度で添加され、20〜40℃、好ましくは3〜37℃で1〜19時間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を達成できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは抗体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射線性物質や酵素などで標識した抗体（抗体）を抽出する方法、抗体融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられるまたはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を抽出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射線性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を抽出する方法などがあげられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。適当HAT（ヒポキサンチン、アミノ

テリン、チミジン)を添加した動物細胞増殖地で行なうことができる。選別および培養増殖地としては、ハイブリドーマが生産できるものならどのような増殖地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640増殖地、1~10%の牛胎児血清を含むG17増殖地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清増殖地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養期間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0032】(b)モノクローナル抗体の精製
モノクローナル抗体の分離精製は、自公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法(例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸着法、超遠心法、ゲルの過渡、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行なうことができる。

【0033】(ポリクローナル抗体の作製)本発明のポリクローナル抗体は、それ自体未知あるいはそれに連じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘン抗原等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~2.0、好ましくは約1~5の割合でカプラーする方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプラーには、種々の重合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリリル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。重合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは抗体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週間に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方

法で免疫された温血動物の血液、尿水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を有するアンチセンスDNA(以下、アンチセンスDNAの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する)としては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

【0034】本発明のDNAの塩基配列に実質的に相補的な塩基配列またはその一部分の塩基配列とは、例えば、本発明のDNAの塩基配列に相補的な塩基配列(すなわち、本発明のDNAの塩基配列)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相補性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補的な全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列(例えば、開始コドン付近の塩基配列など)の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相補性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。以下に、①本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩(以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある)、②本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、③本発明のポリペプチドに対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、④およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0035】(1)本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤
本発明のポリペプチドは後述の実施例1および図3に示すとおり、既知のLH、FSH、TSHのペプチドサブユニットと高い相補性を示し、他のサブユニット(例えばアルファサブユニット、具体的に記す番号:7で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列)を含有するポリペプチドなど。「実質的に同一」とは上記の本発明のポリペプチドと同様に、アルファサブユニットの含有する活性またはアルファサブユニットと本

発明のポリペプチドが会合することにより発現される活性が性質的に(例、生化学的に、または薬理学的に)同質であることを意味する。)と会合することにより生理活性が発現される。また、既知のLH、FSH、TSH等と同様に、配列番号:1の36番目(Cys)-84番目(Cys)間、50番目(Cys)-99番目(Cys)間、80番目(Cys)-115番目(Cys)間、64番目(Cys)-117番目(Cys)間、120番目(Cys)-127番目(Cys)間、配列番号:11の35番目(Cys)-83番目(Cys)間、49番目(Cys)-98番目(Cys)間、59番目(Cys)-114番目(Cys)間、83番目(Cys)-116番目(Cys)間、119番目(Cys)-126番目(Cys)間でそれぞれS-S結合を有すると考えられる。後述の実施例1に記載のとおり、本発明のポリペプチドは既知のLH、FSH、TSH等において、アルファサブユニットとの会合に必要な因子の一つであるS-S結合をとりうるCysが欠落しているため、他のサブユニットと会合せずに、本発明のポリペプチド単独でも生体活性が発現される。従って本発明のポリペプチドをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、または本発明のポリペプチドのレセプター-蛋白質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合には、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、糖尿病、急性バクテリア感染、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸器症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治療、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝臓炎、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクテリア・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(1型)、(変異型)ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄瘤、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(2型)、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨髄性白血病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、遺伝性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、骨髄腫瘍、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心臓腫瘍、血管性/多発性痴呆、早老症治療、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不

全、糖尿、尿毒症、または神経変成疾患等の種々の疾病が発症する可能性が高い。従って、本発明のポリペプチド、本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾病の治療・予防剤などの医薬品として使用することができる。

【0036】本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のポリペプチドを該患者に投与することによって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発現させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエータドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは誘取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて塩化を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはほぞれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0037】錠剤、カプセル剤などに混和することができるとしては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラングロ、アラビガムなどの結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、シロップ、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはフェニルのような香味剤などが用いられる。調剤粒に塩酸がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに脂肪のような脂肪担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用材のようなベヒクルの活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産植物油など

を溶解または懸濁させるなどの通常の製剤形態に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖その他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソールビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤（例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。粘性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無塩化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブルに充填される。本発明の DNA が挿入されたベクターも上記と同様に調製される。通常、非経口的に使用される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは霊長動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イス、サル、など）に対して投与することができる。

【0038】本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチドを経口投与する場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき該ポリペプチドを約 0.1 mg ～ 1.0 mg、好ましくは約 1.0 ～ 5.0 mg、より好ましくは約 1.0 ～ 2.0 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチドの 1 日投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチドを注射剤の形で成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該ポリペプチドを約 0.01 ～ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ～ 2.0 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ～ 1.0 mg 程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0039】(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは下体重前薬ホルモン（LH、FSH、TSH など）に関連する生理活性などを有するため、本発明のポリペプチドの機能（例、下体重前薬ホルモン（LH、FSH、TSH など）に関連する生理活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、

急性ウイルス脳炎、成人呼吸促進症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治療、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸/直腸がん）、クローン病、痛風、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ菌感染、肝不全、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、肝炎、単核ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インフルエンザ依存性糖尿病（I 型）、（持続性）ブドウ球菌性感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II 型）、非小細胞肺癌、食道癌、骨関節炎、骨軟化症、骨質減少、骨髄嚢腫、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、神経分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌がん、腎臓病、胃がん、全身体重減少等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。該スクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または置換型本発明のポリペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドとその受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明のポリペプチドの受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラキシン誘導、アセチルコリン誘導、細胞内 Ca²⁺ 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトール三リン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性など）を有する化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のポリペプチドとの結合性を変化させる」とは、本発明のポリペプチドとの結合を阻害する場合と本発明のポリペプチドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

【0040】すなわち、本発明は、本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリー

ニング方法、具体的には、(i) 本発明のポリペプチドの受容体もしくはその塩または該本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明のポリペプチドの受容体もしくはその塩または該本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体の結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明のポリペプチドの受容体または該本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドに、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明のポリペプチドの受容体または該本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドに、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明のポリペプチドの受容体または該本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドに対する本発明のポリペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

【0041】本発明のスクリーニング方法は具体的に、は、

①標識した本発明のポリペプチドを、上記した本発明のポリペプチドの受容体もしくはその塩または本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体もしくはその塩または本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの該本発明のポリペプチドの受容体もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法。

②標識した本発明のポリペプチドを、本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞または該細胞の細胞膜に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞または該細胞の細胞膜に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの該細胞または該細胞膜に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法。

③標識した本発明のポリペプチドを、本発明のポリペ

プチドの受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドの本発明のポリペプチドの受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法。

【0042】④本発明のポリペプチドの受容体を活性化させる化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のポリペプチドの受容体を活性化させる化合物および試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のポリペプチドの受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトール脂生成、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のポリペプチドの受容体を活性化させる化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明のポリペプチドの受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合と、本発明のポリペプチドの受容体を活性化させる化合物および試験化合物を、本発明のポリペプチドの受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、本発明のポリペプチドの受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトール脂生成、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

【0043】本発明のスクリーニング方法の具体的な説

明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のポリペプチドの受容体としては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜成分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組織換体を用いて大量発現させた本発明のポリペプチドの受容体などが適している。本発明のポリペプチドの受容体とは製造するには、前述の本発明のポリペプチドの製造方法などが用いられる。本発明のスクリーニング方法において、本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜成分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。本発明のポリペプチドの受容体を含む細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。本発明のポリペプチドの受容体を含む細胞としては、本発明のポリペプチドの受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明のポリペプチドの受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。細胞膜成分としては、細胞を破壊した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる成分のことをいう。細胞の破壊方法としては、Potter-Elvehjem型ホモナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーキングバロウ-ポリトロン(Kinematic社製)による破壊、超音波による破壊、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破壊などが挙げられる。細胞膜の成分には、分離遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分離法が主として用いられる。例えば、細胞破壊液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる上清を膜成分とする。該膜成分中には、発現した本発明のポリペプチドの受容体と細胞由来のリソソームや膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該本発明のポリペプチドの受容体を含む細胞や膜成分中の本発明のポリペプチドの受容体の量は、1細胞当たり $1.0^1 \sim 1.0^4$ 分子であるのが好ましく、 $1.0^1 \sim 1.0^4$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜成分当たりの本発明のポリペプチド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0044】本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)をス

クリーニングする前記の④~⑥を実施するためには、適当な本発明のポリペプチドの受容体成分と、標識した本発明のポリペプチドなどが用いられる。本発明のポリペプチドの受容体成分としては、天然型の本発明のポリペプチドの受容体成分が、またはそれと同等の活性を有する組織換型本発明のポリペプチドの受容体成分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等の本発明のポリペプチド結合活性などを示す。標識した本発明のポリペプチドとしては、標識した本発明のポリペプチド、標識した本発明のポリペプチドアナログ化合物などが用いられる。例えば、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識された本発明のポリペプチドなどを利用することができる。具体的には、本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明のポリペプチドの受容体を含む細胞または細胞の膜成分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプタータンパク質を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの本発明のポリペプチドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであれば、いずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アラシス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPMFS、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~1.0mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~50000cpm)の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に $1.0^{10} \sim 1.0^{14}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で過渡し、適量のバッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に吸着する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウン

(B₀)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウン

(B₀-NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0045】本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)をスクリーニングする前記の④~⑥の方法を実施するためには、本発明のポリペプチドの受容体を介する細胞膜刺激活

性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノントーリン脂質生成、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のポリペプチドの受容体を発現した細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のポリペプチドの受容体を発現した細胞に對する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のポリペプチドの受容体を発現した細胞に對する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のポリペプチドの受容体を発現した細胞に對する産生抑制作用として検出することができる。

【0046】本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と本発明のポリペプチドの受容体との結合性を变化させる化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドの受容体またはその塩、本発明のポリペプチドの受容体の部分ペプチドまたはその塩、本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞、あるいは本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞の膜成分、および本発明のポリペプチドを含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調整しても良い。

②本発明のポリペプチドの受容体標品

本発明のポリペプチドの受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁴個/穴で播代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識された本発明のポリペプチド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のポリペプチド

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

④本発明のポリペプチド標準液

本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

10 【0047】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のポリペプチドの受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加えらる。

②1.0×10⁴個の試験化合物溶液を5μlに加え、その後、標識した本発明のポリペプチドを5μlに加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに1.0×10⁴Mの本発明のポリペプチドを5μlに加えおく。

20 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のポリペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(旭光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式(数1)で求める。

(数1)

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

30 PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

【0048】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合を变化させる(結合を阻害あるいは促進する)化合物(本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物)であり、具体的には本発明のポリペプチドの受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆる本発明のポリペプチドの受容体アゴニスト)、あるいは放射線活性を有しない化合物(いわゆる本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニスト)である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよい。公知の化合物であってもよい。上記本発明のポリペプチドの受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記の④のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドの受容体との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明のポリペプチドの受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のポリペプチドの受容体アゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞に接触させ、上記本発明のポリペプチドの受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のポリペプチドの受容体アゴニストである。

(b) 本発明のポリペプチドの受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドの受容体アゴニストなど）を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のポリペプチドの受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明のポリペプチドの受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のポリペプチドの受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明のポリペプチドの受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させる化合物またはその塩は本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニストである。該本発明のポリペプチドの受容体アゴニストは、本発明のポリペプチドの受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生体活性と同様の作用を有しているため、本発明のポリペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。逆に、本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニストは、本発明のポリペプチドの受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生体活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

【0049】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチ性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

【0050】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、高薬手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチド等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとなることができ、このようにして得られる

製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、神経性疾患治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口投与に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、神経性疾患治療の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.1～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のポリペプチドの定量化

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量化、特にサンドイッチ免疫測定法による定量化などに使用することができる。

【0051】すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標準化された本発明のポリペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標準化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量化、および(ii) 被検液と抗体上に不溶化した本発明の抗体および標準化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたもの、不溶化抗体上の標識抗体の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量化を提供する。上記(i)の定量化においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドのN末端を認識する抗体と、他方の抗体が本発明のポリペプチドのC末端に反応する抗体であることが望ましい。また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドの定量化を行うことができるが、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab₂、あるいはFab₂部分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量化は、特に刺激されるべきではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であ

れば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、凝合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0052】標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、

^{14}C などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンコリン酸水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンインシチオサフレートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルンペリン、ルンゲンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また適当なポリペプチドあるいは酵素を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定数することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよい時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1価型である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2価型以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0053】本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのC末端を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端以外、例えばN末端を認識する抗体が用いられる。本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、凝合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。凝合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたの

ち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fのいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定数する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い、第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し、被検液中の抗原量を定数する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定法を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛綱「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛綱「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版) (医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版) (医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A)), 同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B)), 同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C)), 同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays)), 同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Inhibition Assays and General Immunoassay Methods)), 同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part F:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることにより、本発明のポリペプチドを感度良く定数することができる。

【0054】さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定数することによって、本発明のポリペプチドの濃度の減少または増加が検出された場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内瘡、緑内障、急性バクテリア菌血症、急性心筋梗塞、急性肝

炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クロニン病、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（1型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、胃炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（2型）、非小細胞肺がん、膵臓移植、膵膵炎、骨軟化症、骨質減少、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、骨髄腫、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発性脳梗塞、創傷治癒、不眠症、関節炎、下嚥体ホルモン分泌不全、潮熱、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病である。または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの発現の分析などのために使用することができる。

【0055】（4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは霊長動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの検出、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過剰などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics）、第5巻、874〜879頁（1989年）、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）、第86巻、2

766〜770頁（1989年）などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過剰が検出された場合も、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア肺炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クロニン病、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（1型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、胃炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（2型）、非小細胞肺がん、膵臓移植、膵膵炎、骨軟化症、骨質減少、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、骨髄腫、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発性脳梗塞、創傷治癒、不眠症、関節炎、下嚥体ホルモン分泌不全、潮熱、尿毒症、または神経変成疾患等である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0056】（5）アンチセンスDNAを含有する医薬【0056】（5）アンチセンスDNAを含有する医薬本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア肺炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クロニン病、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依

行性糖尿病(Ⅰ型)、免疫性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(Ⅱ型)、非小細胞肺癌がん、膵臓移植、骨関節炎、骨軟化症、骨質減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーシェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌がん、腎臓損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心尖膜症、血管性/多発梗塞発作、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、糖尿病、尿毒症、または神経変性疾患等の疾病の治療・予防剤として使用することができる。

【0057】例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手続に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは採取促進のために補助剤などの生理学的に認められる宿主とともに製剤化し、遺伝子送与やマイクロカプセルのようなカプセルによって投与できる。さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0058】(6) 本発明の抗体を含有する医薬 本発明のポリペプチドを中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローム病、癌、糖尿病性合併症、糖尿病性神経、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、腎炎、ヘルペスウイルス・ヒト免疫不全、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレストロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(Ⅰ型)、免疫性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(Ⅱ型)、非小細胞肺癌がん、膵臓移植、骨関節炎、骨軟化症、骨質減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーシェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性

真菌感染症、小細胞肺癌がん、腎臓損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心尖膜症、血管性/多発梗塞発作、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、糖尿病、尿毒症、または神経変性疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

【0059】本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な量の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の神経疾患患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.1~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容される他の、希釈剤もしくは緩衝剤を含むものがある。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体制剤は錠剤の剤形、具体的に錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自己公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる他の、希釈剤もしくは緩衝剤を含有するものである。例えば、錠剤用の固体制剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0060】非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射、皮下注射、皮内注射、筋肉注射、点滴注射などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自己公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を適当な注射剤に用いられる無菌の水溶性もしくは油溶性に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤(例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil))などと併用してもよい。

油性液として、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブルに充填される。直観投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の形態に調製される、ごく好都合である。かかる投薬単位の形態としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンブル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位形態当たり通常5〜500mg、とりわけ注射剤では5〜100mg、その他の形態では10〜250mgの上記抗体が含まれていることが好ましい。なお前記したる組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0061】(7) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明の外來性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外來性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2)非ヒト哺乳動物がゲッ動物である第(1)記載の動物、(3)ゲッ動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4)本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる遺伝子ベクターを提供するものである。本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階）から一つ前に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外來性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6J系統、DBA2系統など、交雑系として、B

6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる遺伝子ベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0062】本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本発明している本発明のDNAでなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAという。

10 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、変異DNAも含まれる。該変異DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現せしめるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現せしめる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を動物細胞の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作成することができる。

【0063】本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入子型などのバクテリオファージ、モロニー白血ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDNA発現前を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン1、ウログアニンI、エラスターゼ、エリトロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリアル線維性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1、K10およびK

【0065】本発明の正常DNAを育する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内性的正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができ、例えば、本発明の正常DNAを転移動物を用いて、本発明

のポリペプチドの機能亢進や、本発明のポリリブチド
30 の治療方法の検討をなさることが可能である。また、本発
明の外生性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した
本発明のポリリブチドの増加症状を有することから
本発明のポリリブチドに関連する疾患に対する治療薬の
スクリーニング試験にも利用可能である。一方、本発明
の外生性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配に
より外生性DNAを安定に保持することを確認して該DNA
保有動物として通常の飼育環境で世代飼育すること
が出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラス
ミッドに組み込んで原料として用いることができる。プロ
40 モーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA
工学的手法によって作製することができる。受精細胞
段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動
物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するよう確保
される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本
発明の異常DNAが存在すること、作出動物の子孫が
全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常
DNAを有すること意図される。本発明の外生性DNAを
受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞およ
50 び体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNA
を細胞核の核膜の両方に持つカイロミグロ動物を取

し、この複製の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0066】本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外発異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたはその機能不活性化型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標的組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の異常ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などに寄与される。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA転移動

物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性化型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および選定法などを用いて、有効な迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外発性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドに関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0067】（8）ノックアウト動物

- 10 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、（1）本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- （2）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、（3）ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、（4）非ヒト哺乳動物がゲグ動物である第（1）項記載の胚幹細胞、（5）ゲグ動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、（6）本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、（7）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現する第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- （8）非ヒト哺乳動物がゲグ動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、（9）ゲグ動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および（10）第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）を用いる。非ヒト哺乳動物とは、前記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コードの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソン領域を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

【0068】本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳

51

乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を含入することによりエクソンの読断を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセージ- RNAを合成できなくすることによって、経早的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を識別することにより得ることができる。また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のように既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかでないES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスとC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改良したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は兩性モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでの遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用いる。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系系列キメラを作出するのに割合が良い。また、雌雄は胚盤胞の形成を創成するためにできるだけ早く雌雄の判別を行うことが望ましい。

【0069】ES細胞の雌雄の判定方法としては、例え

52

ば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅・検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析するのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=4である細胞）に再びクロソニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO横断芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-100000U/ml）存在下に液相培養（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に接種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日再に行うが、この間に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂前、内臓系、心臓などの様々なタイプの細胞に分化させることが可能であり（M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ナチュラル・ナチャー（Nature）第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin フロンティア・オブ・サイエンス・アカデミー・オブ・サイエンス・ユース・エー（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman, ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年）、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学の検討において有用である。

【0070】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNAを公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものを用いる。本発明のDNA発現不

50

金非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同置換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同置換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザナハイブリダイゼーション解析またはターゲティングベクター上のDNA配列と、ターゲティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合、遺伝子相同置換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚芽または胚盤腔に注入し、作製したキメラ胚を妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両方から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての細胞が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの形質等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のヘテロ発現不全個体遺伝子を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

【0071】卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同置換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選別することにより得られる。このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育栽培を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化DNAを相同染色体の両方に持つホモサイゴート動物を取得する。得られたホモサイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモサイゴート雑種になるような状態で飼育することにより効率的に得ること

ができる。ヘテロサイゴート動物の胚嚢を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモサイゴートおよびヘテロサイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作成する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質により誘導される種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0072】(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物に変化を観察・測定することを特徴とする。本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供すること。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的に、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処置し、無処置の対照動物と比較し、該動物の器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処置する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0073】例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、痔内痔、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス肝炎、成人呼吸促進症候群、アルコール性肝炎、アルコール中毒、糖尿病、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、腎臓、乳がん、過食症、多食症、火傷治療、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クロン病、癌、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝

炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(Ⅰ型)、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(Ⅱ型)、非小細胞肺癌がん、鼻咽癌腫、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、胃ペーチャット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌がん、腎臓損傷、胃がん、金静脈リチアマトーナス、一過性脳虚血発作、結核、心臓病、血管性/多発性虚血、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、糖尿病、尿毒症、または神経変性疾患等に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に慢性的な疾患を行ない、慢性的な疾患前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血値値および体重変化などを経時的に測定する。

【0074】該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血値値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬品として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から篩選される化合物も同様に行うことができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される例(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、炭化水素酸、硫酸など)の塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸など)と、および生理学的に許容される付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルな

ど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約0.1~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg投与、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0075】(8b)本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現するものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレーサーすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)で置換している場合、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモーター-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド(N-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩

液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37度で待て、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試料化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される鹽(例、無機酸など)や塩基

(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)の塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

【0076】本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進または阻害し、該ポリペプチドの機能を促進または阻害することができる。例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、線形、急性バクテリア脳膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸器 distress 症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治療、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、腎炎、ヘリコバクター・ピロリ感染、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高リゼリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(I型)、免疫性ブドウ球菌前庭炎、悪性黒色癌、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン型リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺がん、脳器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、胃ペーシェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重度全身性真菌感染症、小細胞肺がん、腎臓腫瘍、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心臓病、血管性/多発性痴呆、創傷治療、不眠症、関節炎、下垂体ホ

ルモン分泌不全、糖尿病、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0077】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様に製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより変異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg相当りに換算した量を投与することができる。一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.1~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg相当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因説明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができるとする。また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に様々なタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入してivmの

るトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の標薬系として使用できる。

*【0078】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ立体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン
R	: アデニン (A) または グアニン (G)
Y	: チミン (T) または シトシン (C)
M	: アデニン (A) または シトシン (C)
K	: グアニン (G) または チミン (T)
S	: グアニン (G) または シトシン (C)
W	: アデニン (A) または チミン (T)
B	: グアニン (G)、グアニン (G) または チミン (T)
D	: アデニン (A)、グアニン (G) または チミン (T)
V	: アデニン (A)、グアニン (G) または シトシン (C)
N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしくは チミン (T) または 不明もしくは他の塩基
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
BHA	: ベンズヒドロルアミン
pMBHA	: p-メチルベンズヒドロルアミン
Tos	: p-トルエンスルフォニル
Bzl	: ベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
DCM	: ジクロロメタン
HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
DCC	: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
TFA	: トリフルオロ酢酸
DEEA	: ジイソプロピルエチルアミン
CHO	: ホルミル
Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル

61		62
Br r Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル	
DNP	: ジニトロフェノール	
Tr t	: トリチル	
B um	: t-ブトキシメチル	
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル	
HOOb t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン	
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ホルボルエン-2,3-ジカルボキシイミド	
G ly	: グリシン	
Ala	: アラニン	
Val	: バリン	
Leu	: ロイシン	
I le	: イソロイシン	
Se r	: セリン	
Thr	: スレオニン	
Cys	: システイン	
Me t	: メチオニン	
G lu	: グルタミン酸	
As p	: アスパラギン酸	
Ly s	: リジン	
Ar g	: アルギニン	
Hi s	: ヒスチジン	
Ph e	: フェニルアラニン	
Tyr	: チロシン	
Tr p	: トリプトファン	
Pro	: プロリン	
As n	: アスパラギン	
G ln	: グルタミン	
p Gl u	: ピログルタミン酸	

【0079】本発明の配列表の配列番号は、以下の
配列を示す。

【配列番号：1】後述の実施例1で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：2】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：3】後述の実施例1で用いられるプライマーLF2の塩基配列を示す。

【配列番号：4】後述の実施例1で用いられるプライマーLR1の塩基配列を示す。

【配列番号：5】後述の実施例1で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列中、シグナル配列と予想されるN末端から1～24番の部分アミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列を示す。

【配列番号：6】

配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：7】ヒト型アルファサブユニットのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：8】

配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：9】後述の実施例2で用いられるプライマーLSF2の塩基配列を示す。

【配列番号：10】後述の実施例1で用いられるプライマーLSR1の塩基配列を示す。

【配列番号：11】後述の実施例2で得られた本発明のポリペプチド（ラット型）のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：12】

配列番号：11で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：13】後述の実施例2で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列中、シグナル配列と予想されるN末端から1～23番の部分アミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列を示す。

【配列番号：14】

配列番号：13で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：15】後述の実施例3で用いられるプライ

マーベXIIの塩基配列を示す。

【配列番号：10】後述の実施例3で用いられるプライマーN1の塩基配列を示す。

【0080】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いた遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。実施例1で得られたプラスミドpTAKGTHL6を保持する*Escherichia coli* JM109/pTAKGTHL6は2000年11月9日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(N1BH)にFERMR B-P-7356として寄託され、また2000年10月24日に日本国大阪府淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8866)の財団法人発酵研究所(IFO)にIFO16489として寄託されて本

LF2:5'-CGGAGAGCAGCATGAAGCTGGCATTC-3' (配列番号:3)

LR1:5'-CATCTGCTCTCTCACACAGTGGCTGCTG-3' (配列番号:4)

PCRの反応液はcDNA溶液0.1μl(1ng poly(A)+RNA由来)、0.5μl LF2(10μM)、0.5μl LR1(10μM)、2.5μl 添付の10×反応液、2.5μl dNTP(10mM)、0.25μl Ex Taq(タカラ)、18.65μl 蒸留水を加えて合計25μlにした。反応液をThermalCycler9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、65℃・10秒、72℃・20秒のサイクルを35回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約450bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQiaquick purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図1で示す配列がえられた。図1のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図2に示すものであった。予測されるアミノ酸配列のN末端領域には疎水性の高い典型的なシグナル配列が存在し、この蛋白質が24番目のGlyと25番目のAlaの間で切断されて分泌されることが予想された。また87番目のAsnが糖鎖の付加を受ける可能性があることが配列から予想された。さらにS-S結合は他のホルモンとの比較より、36-84、50-99、60-115、64-117、120-127番目のシステイン残基の間で※

r2SF2:5'-AGGCAGCTGATACAGACAGGAGAG-3' (配列番号:9)

r2SF1:5'-CTTGGGACGACCATGACTGTGCT-3' (配列番号:10)

を合成した。ラット脳腫瘍poly(A)⁺RNAよりSuperScriptII reverse transcriptase(GIBCO-BRL社)とrandom 7mer(GIBCO-BRL社)を用いて合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応液はAdvantage 2 polymerase (Clontech社)をDNA polymeraseとして用い、これに添付のバッファを2.5μl、各プライマー 200μMと各0.1mM dNTPを混ぜて総反応液量25μlとして調製し、98℃ 10秒、68℃ 45秒のサイクルを34サイクル繰り返した。PCR反応産物を2%アガロース電気泳動に付し、バンドをエチジウムブロムリド染色によって検出した。その結果得られた約

※1. 実施例2で得られたプラスミドpRGON7を保持する*Escherichia coli* JM109/pRGON7は2000年11月9日にN1BHにFERMR B-P-7354として寄託され、また2000年10月24日にIFOにIFO16487として寄託されている。

【0081】実施例1 ヒト下垂体poly(A)⁺RNA画分からのcDNA合成とRT-PCR法による新規ホルモンh098489のcDNAの取得
クローンテック社より購入したヒト下垂体poly(A)⁺RNA画分1μgにプライマーとしてOligo(dT)プライマー(Gibco-BRL社)を加え、モロニマウス白血病毒の逆転写酵素(Gibco-BRL社)により、添付バッファを用いてcDNAを合成した。反応産物はエタノール沈殿を行った後、100μlのTEに溶解した。調製したcDNA 0.1μlを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

(配列番号:3)

(配列番号:4)

20※きていることが予想された。特に興味深いことはLH、FSH、TSH等に置いてアルファサブユニットとの会合に必須と考えられているS-S結合をとりうるシステインが欠落しておりこの新規ホルモンh098489がサブユニット構造を取らずに単独でも作用しうることが示唆された。得られた配列の相関性を調べたところ既知の下垂体由来のホルモンの、特にLH、FSH、TSHなどのベータサブユニットと高い相関性を示した(図3)。また、約450bpのPCR産物をTA cloning kit (Invitrogen社)のマニュアルに従い、クローニングベクターpCR2.1 TOPへ挿入し、大腸菌JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/pTAKGTHL6を得た。

【0082】実施例2 ラット脳腫瘍からの新規ホルモンh098489のラット型cDNAの取得
ラット脳腫瘍poly(A)⁺RNAから合成したcDNAを鋳型として、ラット型の新規ホルモンh098489cDNAをPCR法にて取得した。開始コドンの上流域と終結コドンの下流域にそれぞれ1本のプライマー

540bpのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて精製し、TA cloning kit (Invitrogen社)のマニュアルに従い、クローニングベクターpCR2.1 TOPへ挿入し、大腸菌JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/pRGON7を得た。このプラスミドpRGON7に挿入されている配列(配列番号:12)を決定し、該塩基配列およびそれにコードされるラット型の新規ホルモンh098489の予測されるアミノ酸配列(配列番号:11)を図4に示した。また実施例1に示したヒト型配列との比較を図5に示した。

【0083】実施例3 ヒト型新規ホルモンVH098489発現CHO細胞の作成

ヒト型新規ホルモンVH098489発現CHO細胞の作製は以下 本

VHF1:5' -CTCGAGGACGACATGAAGCTGGCATGCTCT-3' (配列番号:15)

VHF1:5' -GCTACGGGCTCAGATGGTCTCAGACTCGGT-3' (配列番号:16)

これらの合成DNAを用いて実施例1で作製した寄託菌*Escherichia coli* JM109/pTAhGTHL6の保持するプラスミドpTAhGTHL6を挿入してPCRを行った。PCRの反応液はプラスミド溶液1 μ l (1 μ g), 1 μ l VHF1 (10 micro M), 1 μ l VHF2 (10 micro M), 5 μ l 添付の10 \times 反応液, 5 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l Ex Taq (タカラ), 36 μ l 蒸留水を加えて合計50 μ lとした。反応液をThermalcycler9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95 $^{\circ}$ C 2分の変性後、98 $^{\circ}$ C 10秒、65 $^{\circ}$ C 10秒、72 $^{\circ}$ C 30秒のサイクルを2回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約0.5 kbのPCR産物の増幅を確認した後、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社)を用いて大腸菌にサブクローニングした。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドをプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が実施例1と同じヒト型新規ホルモンVH098489 cDNAであることを確認した。次にそのプラスミドから制限酵素XbaIおよびMneIによって消化後約0.5 kbのヒト型新規ホルモンVH098489 cDNA断片を得た。さらに、動物細胞用の発現ベクターであるpAKKO-1111はマルチクローニングサイト部分の制限酵素サイトSalIおよびMneIによって消化後、電気泳動を行い、ベクター部分を回収した。以上の操作によって調製したヒト型新規ホルモンVH098489cDNA断片および発現ベクターをライゲーションによって連結し、大腸菌JM109を形質転換してE.coli JM109/pAKKGTHLを得た。形質転換体E.coli JM109/pAKKGTHLを培養し、プラスミドpAKKGTHLのDNAを大量に調製した。そのプラスミドDNAのうちの20 μ gを1mlの生理的食塩水 (PBS)に溶解後、ジエントランスフォー (和光純薬) のバイアルに注入し、ポルテックスミキサーを用いて激しく攪拌してDNAを含有するリボソームを形成させた。CHO-dfr^r細胞1ないし2 \times 10⁶個を直径3.5mmの細胞培養用シャーレに播種し、2日間培養した後培養液を新鮮なものに交換した。各シャーレに対して0.5 μ gのDNAに相当する量(2.5 μ l)のリボソーム液を滴下し、16時間インキュベーションを行ってプラスミドDNAの導入を行った。さらに新鮮な培地に交換して1日間培養した後、選択培地に交換して3日間培養を続け、最後にトリプシン消化を行って分散させた細胞を低密度で選択培地 (deoxyribonucleosidesおよびribonucleosidesを含有しない α -minimal essential medium, alpha medium) 10%選別ウシ血清を加えたもの)中に播種し、形質転換体の選択を行った。形質転換体のみが選択培地中で増殖することが可能であり、継代を繰り返すことによって選択を重

くように行った。GTHLの配列に基づき以下の2種類の合成DNAを合成した。

ね、CHO-GTHL細胞を樹立した。ヒト型新規ホルモンVH098489を高発現するクローンの選択は、細胞のクローン化と、メトトレキセート (シグマ社) 濃度の段階的な増加を交互に繰り返すことを行なった。昌樹細胞における産量の測定と高産生クローンの選択は、後述のELIAによって行なった。

【0084】実施例4 新規ホルモンVH098489に対する抗血清の取得
新規ホルモンVH098489に対する抗体の作製は次のように行なった。新規ホルモンVH098489の分分泌シグナル配列直後の、N末端部の配列ASSQLRTPVAGCにシステインを付加したASSQLRTPVAGC (GTHL) を抗原として用いた。GTHLをKLHとコンジュゲートしてウサギに定法に従って免疫し、GTHLに対する抗血清を取得した。抗体価の上昇の検計は、GTHLをA/Cに結合させたものをコーティングしたプレートと、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を用いた定法による固相法ELIAにて行ない、免疫前の血清と比較して図6のような抗体価を示す抗血清を取得した。

【0085】実施例5 ヒト型新規ホルモンVH098489の発現の検出
上記のCHO-GTHL細胞を無血清培養し、上清を回収、限外ろ過法にて濃縮を行なった。濃縮した上清はSDS-PAGE用のサンプルバッファーに溶解し、加熱変性後、16%ゲルを用いたSDS-PAGEにて電気泳動を行なった。電気泳動によって分離した蛋白質はニトロセルロース膜に電気的に転写した。非特異的な結合を予防するためにブロッカエース (大日本製薬) で染を処理した後、ブロッカエースを10%、Tween-20 (シグマ社) を0.1%含むPBSで適宜希釈した上述の抗血清とインキュベートした。その後、ニトロセルロース膜を洗剤洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体とさらにインキュベート、未結合の標識抗体を充分に洗浄した。メンブリンに転写されたヒト型新規ホルモンVH098489は西洋ワサビペルオキシダーゼの発色反応によって検出した (図7)。

【0086】実施例6 新規ホルモンVH098489のELIA測定系の構築
上述の抗GTHL抗血清を5.0%濃度の碳酸アンモニウムによって処理し、沈殿した固分をPBSに再溶解した。GTHLペプチドを市販のカラム (HiTrap NHS-activated, フェルマシア社) に結合させて作製した抗原カラムを用い、付属のマニュアルに従って抗原捕集を行なった。GTHLペプチドを定法に従ってマレイミド法で西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させ、未結合のペプチドをゲルろ過

分離した後、GTM標識体を得た。EIA用の96ウェルプレートに抗ウサギIgFを結合させ、その後、25%のブロックエースを含有するPBSとインキュベートして非特異結合を防止する処理を行なった。まず、精製抗体とスタンダード（GTMペプチド）あるいはサンプルと4℃で一晩インキュベーションし、その後GTM標識体を添加して室温でさらにインキュベーションを行なった。アッセイバッファーは10%のブロックエース、0.1%のTween-20を含有するPBSを使用し、反応後に充分に洗浄を行ない、プレートに結合した標識体をペルオキシダーゼの発色反応によって検出した。標識体のプレートへの結合量（B/B0）をもとに検量線（図8）を作成し、サンプル中に含まれる新規ホルモンH098489の濃度を算出した。

【0087】

【発明の効果】本発明のポリペプチドは、例えば、下表

[Sequence Listing]

<11> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<12> Novel Polypeptide and its DNA

<13> 600368

<15> JP 11-358707

<151> 1999-12-17

<150> JP 2000-46825

<151> 2000-02-18

<160> 16

<210> 1

<211> 139

<212> FRT

<213> Human

<400> 1

Met Lys Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Pro Met Ala Leu Leu Leu

5

10

15

Ala Gly Tyr Gly Cys Val Leu Gly Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr

20

25

30

Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro

35

40

45

Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys

50

55

60

Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His

65

70

75

80

His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Lys Glu Val Thr Val Lys Leu

85

90

95

Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Val Ala

100

105

110

Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu

115

120

125

Thr Ile

130

<210> 2

<211> 390

<212> DNA

* 体前薬ホルモン（LH、FSH、TSHなど）に関連する生理活性などを有するため、高血圧、自己免疫疾患、心不全などの治療薬として使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる化合物は高血圧、自己免疫疾患、心不全などの予防・治療剤として期待される。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量などに使用することができる。

【0088】

【配列表】

69

79

<213> Human

<400> 2

ATGAAGCTGG CATTGCTCTT GCTTGGGGG ATGGGCTGC TGGTCTGCG TGGCTATGGC 69
 TGTGTGCTCG GTGGCTCCAG TGGAGACTCG CGACGCTTGG TGGGCTGTGC GGTGAGGAG 129
 TTTACTTTTC TGGCAAGAA CGAGGCTGC AGGGGCTTC GGAACGACG GGTGCTGCG 189
 TGGGTGCGT GTGAGACTCG GGAGAAAGCG ATTCTGGAGC CGGCTATAT TGAAGGGCAT 249
 CATCGAGTCT GTAGCTACAA CGAGGACAAA CAGGTGACTG TCAAGCTGCC CAAGTGTGCC 309
 GGGGAGTGG AGCGCTTCTA CAGCTATGCC GTGGGCATCG GCTGTGACTG CGAGGCTGC 369
 TCCACTGCCA CGAGGAGTG TGAGGAGTC 399

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

GGGAAGACA GGATGAGCT GGCATTG 27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

CATGTGCTGC TCACAGGT GGTCTG 27

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu

1 5 10 15

Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr

20 25 30

Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu

35 40 45

Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu

50 55 60

Thr Lys Gln Val Thr Val Lys Leu Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp

65 70 75 80

Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys

85 90 95

Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr Ile

100 105

<210> 6

<211> 378

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

GCTCCAGTG GGAAGCTGG CAGCTTTGTG GCGTGTGGG TCAAGGAGTT TACTTTCTG 60

```

71
GCCAAGAAGC GAGCGTCAG GGGCTTGGG ATCAGCAGGG ATGCGCTGCG GCGTGGCTGT 120
GAGCGCTGGG AGAAGGCCAT TCTGGAGGCC CCTATATTG AAGGCCATCA TCGAGTCTGT 240
ACCTACAAGG AGAGCAACA GGTGACTGTC AAGCTGGCCA ACTGTGGCCC GCGAGTGGAC 360
CGCTTCTACA CCTATCGCGT GGGCATCGCG TTGACTGGCG GAGCGTGGTC CACTGGCAC 360
ACCGAGTGTG AGAGCATC 378
<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> Human
<400> 7
Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
5 10 15
Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30
Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45
Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60
Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80
Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95
Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110
Tyr His Lys Ser
115
<210> 8
<211> 348
<212> DNA
<213> Human
<400> 8
ATGGATTACT ACAGAAATA TCGAGTATC TTTCGGTCA CATTTGGGT GTTCTGCAT 60
GTCTGCATT CGCTGCTGA TGTGAGGAT TGGCCAGAT GCAGCTACA GGAAGGCCA 120
TTCTTCTGCC AGCGGGTGC CGCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGTT CTCTAGACA 180
TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGCG ATGTGGTGC AAAAGACGT CACCTCAGAG 240
TGCATTGCT GTGAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGG TTTCAGATG 300
GAGAAGACA CGCGTGCCA CTCGAGTACT TGTTATTATC ACAAATCT 348
<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 9
AGGCAGCGCTG ATAACAGAAG GGAGAG 26
<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

```

73
 <223> Primer
 <400> 10
 CTTGGGCCAC CAGCATGAC TGTGCT 26
 <210> 11
 <211> 129
 <212> FRT
 <213> Rat
 <400> 11
 Met Lys Leu Val Tyr Leu Val Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Asp Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Asn Leu His Thr Phe
 20 25 30
 Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Val Ala Lys Lys Pro Gly
 35 40 45
 Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu
 50 55 60
 Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala Tyr His
 65 70 75 80
 Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Arg Arg Val Thr Val Lys Leu Pro
 85 90 95
 Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Met Ala Val
 100 105 110
 Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr
 115 120 125
 Ile
 <210> 12
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 12
 ATGAAGCTGG TATAGCTTGT CCTGTGACT GGGGGCTCC TTCTGGGTGG CTCTGACTCT 60
 GTCTCGACA GCTGACGGG GAAGCTACAC ACTTTTGTGG GATGTGCTGT CAGGGAATTC 120
 ACTTTTGTGG CCAAGAGGCC AGGCTGCAGG GCACTTCGGA TCACCAAGA TGCTCTGTGG 180
 GTGCGTGTTG AGAGCTGGGA GAAGCCATT CTGAGGCTTC CTTACATAGA AGCCTATCAT 240
 CGAGTGTGTA CCTACAATGA GACGACAGCG GTGAGGGTGA AGCTGGCTAA CTGTGGGCTT 300
 GAGTGGAGCC CTTCTACAC CTAGCCTATG GCTGGCGAT GTGACTGGG GGCATGTTC 360
 ACTGGCACA CTGAGTGTGA GACCATC 387
 <210> 13
 <211> 106
 <212> FRT
 <213> Rat
 <400> 13
 Ser Ser Ser Gly Asn Leu His Thr Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu
 1 5 10 15
 Phe Thr Phe Val Ala Lys Lys Pro Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr
 20 25 30
 Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu
 35 40 45
 Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala Tyr His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu
 50 55 60

```

75                               76
Thr Arg Arg Val Thr Val Lys Leu Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp
65                               70       75       80
Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Met Ala Val Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys
85                               90       95

Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr Ile
100                               105

<210> 14
<211> 318
<212> DNA
<213> Rat
<400> 14
AGCTCCAGCG GGAAGCTACA CACTTTTGTG GGATGTGCTG TCAGGGAAIT CACTTTTGTG 60
GCCAAGAAGC CAGGCTGCAG GGAAGCTGCG ATCAGCAGAG ATGCGCTGCT GGTCGCTGCT 120
GAGAGCTCGG AGAAGCCCAT TCTGAGGCTT CCTACATAG AGGCATATCA TCGAGTGTGT 180
ACCTACAATG AGAGCAGAGG GGTGAGGGTG AAGCTGCTTA ACTGTGCCC TCGAGTGCAC 240
GCTTTCTACA CCTAGGCTAT GCGTGTCCGA TGTGACTGCG GGGCATGTCT CACTGGCACC 300
ACTGAGTGTG AGAGCATC
318

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 15
CTCGAGAGCA GCATGAAGCT GGCATTCTC T 31

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 16
GCTAGCGGCC TCAGATGCTC TCACACTCGG T 31

```

【0089】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）をコードするDNAの塩基配列を示す。

【図2】本発明のポリペプチド（ヒト型）のアミノ酸配列を示す。

【図3】本発明のポリペプチドと既知のLH、FHS、TSHのベータサブユニットとのアミノ酸配列の比較を示す。

【図4】実施例2で得られた本発明のポリペプチド（ラット型）をコードするDNAの塩基配列および対応するアミノ酸配列を示す。

【図5】配列番号：1で表される本発明のポリペプチド（ヒト型）と配列番号：11で表される本発明のポリペ

プチド（ラット型）との配列比較を示す。

【図6】WH98489Cに対する抗血清の抗体価の測定結果を示す。免疫前（Preimmune Serum）および免疫後（Antisera）のGTNIに対する抗体価を希釈法によって比較した。

【図7】WH98499のEIA測定系の標準曲線を示す。縦軸はスタンダード（GTNIペプチド）の濃度、横軸は標識体の結合量（B/B0）を示す。

【図8】WH98499発現CHO細胞（CHO-GTNI）およびコントロール細胞（mock）のウエスタンブロットによる解析結果を示す。培養上清（sup）および細胞（cell）のそれぞれについて抗GTNI抗体を用いたウエスタンブロットを実施した。図の左側には分子量マーカーの位置を示す。

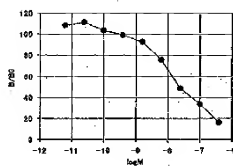
【図4】

1	ATGAAGCTGGTATACCTTGTCCTTGGGACTGCGGCCCTCCTTCCTGGGTGGCTCTGACCT	60
1	MetLysLeuValTyrLeuValLeuGlyThrAlaAlaLeuLeuGlyGlySerAspSer	20
61	GTCTCAGCAGCTCCAGCGGAACTTACACACTTTTGTGGGATGTCGTGTGAGCGGATTC	120
21	ValLeuSerSerSerSerGlyAsnLeuHisThrPheValGlyCysAlaValArgGluPhe	40
121	ACTTTTGTGGCCAGGAACCCAGGCTGCAGGGGACTTCGGGACCCACAGATGCTGCTGG	180
41	ThrPheValAlaLysLysProGlyCysArgGlyLeuArgIleThrThrAspAlaCysTrp	60
181	GGTGGCTGTGAGACCTGGGAGAAACCACTCTGGAGGCTCCCTACATAGAGGCTATCAT	240
61	GlyArgCysGluThrTrpGluLysProIleLeuGluProProTyrIleGluAlaTyrHis	80
241	CGAGTGTGTACCTTACAAATGAGACAGAGCGGTGACCGTGAAGCTGCTTACCTGCCCCCT	300
81	ArgValCysThrTyrAsnGluThrArgArgValThrValLysLeuProAsnCysAlaPro	100
301	GGAGTCGAGCCCTTCTACACCTAGGCTTGGGCTGTCGAGTGGTGGGCGCATGCTTCC	360
101	GlyValAspProPheTyrThrTyrProMetAlaValArgCysAspCysGlyAlaCysSer	120
361	ACTGCCACCACTGACTGCTGAGACCATCTGA	390
121	ThrAlaThrThrGluCysGluThrIle***	130

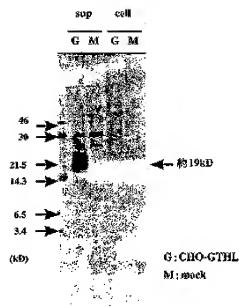
【図5】

1	M K L E F P L G P A L L L L A G V G V L G A S S H A E F F G A V E F F F L A X X P G C	human
1	M K L V T L V L C T A L L L L G S D S V L S S S G L I T F T G C A V E F F F V A X X P G C	Rat
51	G L N L I T F D A C W S C E T W E E F I L E F F Y I S A H R A V C T V N S K G V F V L I H C A	Ramona
56	R G L I E I T F D A C W G C E T W E K P I D E F F Y I E T H E V C T Y N E S F T G V A L P H C A	Rat
101	G V D F F Y T V N A C S G S A S E T A T E C E T T	human
100	P V D F F Y T V N A C S C G G A C E T A T E C E T T	Rat

【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	FI	サーチコード(参考)
A 61 P		A 61 P	
1/00		1/16	4 C 0 8 6
1/04		1/18	4 H 0 4 5
1/16		3/04	
1/18		3/06	
3/04		3/10	
3/06		3/14	
3/10		7/00	
3/14		9/00	
7/00		9/04	
9/00		9/10	
9/04		9/12	
9/10		11/00	
9/12		11/06	
11/00		13/02	
11/06		13/12	
13/02		17/00	
13/12		17/02	
17/00		19/00	
17/02		19/02	
19/00		19/10	
19/02		25/00	
19/10		25/18	
25/00		25/20	
25/18		25/28	

	25/20		27/06	
	25/28		27/12	
	27/06		29/06	101
	27/12		31/04	
	29/06	101	31/10	
	31/04		31/16	
	31/10		31/18	
	31/16		31/20	
	31/18		31/22	
	31/20		35/00	
	31/22		35/02	
	35/00		35/04	
	35/02		37/02	
	35/04		37/08	
	37/02		C07K 14/575	
	37/08		16/26	
C07K 14/575	16/26		C12N 1/15	
	1/15		1/19	
C12N 1/15	1/19		1/21	
	1/21		C12P 21/02	C
	5/10		21/08	
C12P 21/02	21/08		G01N 33/15	Z
	33/15		33/50	Z
	33/50		C12R 1:91	
//(C12N 5/10	33/15		C12N 15/00	ZNAA
C12R 1:91)	33/50		A61K 37/02	
	33/50		C12N 5/09	A
	33/50		C12R 1:91)	

(72)発明者 藤井 亮

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイム303号

(72)発明者 細谷 昌樹

茨城県土浦市飯谷1丁目711番地83

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB26 DA12 DA13 DA36
FB02 FB03 FB08
4B024 AA01 AA11 BA01 BA41 CA04
CA12 DA02 EA04 GA03 GA11
HA01
4B064 AG15 AG27 CA10 CA19 CA20
CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA91X
AB01 AB04 BA05 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA22
CA53 CA56 CA59 NA14 ZA332
ZA362 ZA512 ZA662 ZA752
ZA812 ZA962 ZB072 ZB132
ZB262 ZB332 ZC332 ZC352
ZC782
4C086 AA01 AA03 AA04 EA16 NA14
ZA33 ZA36 ZA51 ZA66 ZA81
ZA96 ZB07 ZB13 ZB26 ZB33
ZC33 ZC35 ZC78
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA30
DA76 EA20 EA50 FA72 FA74